

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2004/008471

10.06.2004

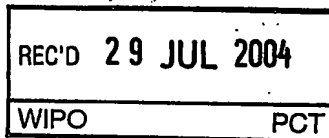
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 6月10日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-165456
[ST. 10/C]: [JP2003-165456]

出 願 人
Applicant(s): 大日本製薬株式会社

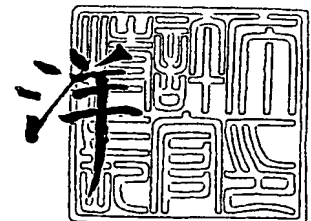


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 H15-15

【提出日】 平成15年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市栗生間谷東7丁目22-9

 【氏名】 筈井 寛

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区稗原町2丁目2番23号

 【氏名】 西本 昌義

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県野洲郡野洲町富波乙665-1

 【氏名】 竹下 仁

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府泉南郡岬町淡輪3631-24

 【氏名】 大軽 靖彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000002912

 【氏名又は名称】 大日本製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100099221

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 吉岡 拓之

 【電話番号】 06-6337-5931

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 058883

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709795

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 急性大動脈解離の判定方法及び判定用試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 急性大動脈解離が疑われるヒトから分離された血液中の D-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法。

【請求項 2】 急性大動脈解離が疑われるヒトが胸痛発作を起したヒトである請求項 1 に記載の判定方法。

【請求項 3】 D-ダイマーの検出を D-ダイマーを認識する抗体を使用する免疫化学的方法により行う請求項 1 又は 2 に記載の判定方法。

【請求項 4】 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求項 3 に記載の判定方法。

【請求項 5】 急性大動脈解離または急性心筋梗塞の両方が疑われるヒトから分離された血液中の D-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定方法。

【請求項 6】 急性大動脈解離または急性心筋梗塞の両方が疑われるヒトが胸痛発作を起したヒトである請求項 5 に記載の判定方法。

【請求項 7】 検出された血液中の D-ダイマー濃度と、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別が可能な血液中の D-ダイマーのカットオフ値とを比較して、前記濃度が前記カットオフ値以上の場合には急性大動脈解離を発症していると判定し、前記カットオフ値未満の場合には急性心筋梗塞を発症していると判定する請求項 5 又は 6 に記載の判定方法。

【請求項 8】 D-ダイマーの検出を D-ダイマーを認識する抗体を使用する免疫化学的方法により行う請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の判定方法。

【請求項 9】 免疫化学的方法が酵素免疫化学的方法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法である請求項 8 に記載の判定方法。

【請求項 10】 急性大動脈解離がスタンフォード分類により A 型に分類される急性大動脈解離である請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の判定方法。

【請求項 11】 急性大動脈解離がスタンフォード分類により B 型に分類される急性大動脈解離である請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の判定方法。

【請求項 1 2】 請求項 3 又は 4 に記載の判定方法を実施するために使用され、少なくとも D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬。

【請求項 1 3】 請求項 1 2 に記載の判定用試薬を含む商業パッケージであって、該判定用試薬を急性大動脈解離の判定に使用できる又は使用すべきであることが該パッケージ上に記載されているか、又は該パッケージ中に前記のように記載した該判定用試薬に関する記載物を含む商業パッケージ。

【請求項 1 4】 請求項 8 又は 9 に記載の判定方法を実施するために使用され、少なくとも D-ダイマーを認識する抗体を含有する急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定用試薬。

【請求項 1 5】 請求項 1 4 に記載の判定用試薬を含む商業パッケージであって、該判定用試薬を急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別に使用できる又は使用すべきであることが該パッケージ上に記載されているか、又は該パッケージ中に前記のように記載した該判定用試薬に関する記載物を含む商業パッケージ。

【請求項 1 6】 急性大動脈解離がスタンフォード分類により A 型に分類される急性大動脈解離である請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の判定用試薬又は商業パッケージ。

【請求項 1 7】 急性大動脈解離がスタンフォード分類により B 型に分類される急性大動脈解離である請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の判定用試薬又は商業パッケージ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液中の D-ダイマー (D-dimer) を検出することによる急性大動脈解離 (acute aortic dissection) の判定方法に関する。また本発明は、前記方法の実施に使用される急性大動脈解離の判定用試薬等に関する。

【0002】

【従来の技術】

D-ダイマーを急性大動脈解離を判定するための生化学的マーカーとして使用

することはこれまでに報告されていない。

【0003】

D-ダイマーは二次線溶系亢進のマーカーとして、血液凝固・線溶系亢進の病態を詳細に把握するために利用されている生体内蛋白である。具体的には、播種性血管内凝固症候群（DIC）や各種の血栓性疾患の診断、病態把握、治療効果判定のマーカーとして使用されている。なお、次に述べる一連の反応過程を二次線溶系という。

【0004】

生体内において止血反応が起こると、その最終段階において、トロンビンと血液第XIII因子（フィブリン安定化因子）の作用により、フィブリンが架橋された安定化フィブリンが生成する。繊維素溶解機構（線溶系）の中で、プラスミンはこの安定化フィブリンを分解し、Xオリゴマーを生成させ、さらに、分解が進むと、最終的にD-ダイマー、E分画、及びD-ダイマー／E分画複合体が生成される。

【0005】

非特許文献1には、急性大動脈解離症例の手術におけるトラネキサム酸（止血剤）大量投与の止血効果について記載されている。ここでは、トラネキサム酸の効果を判断するために、血液凝固のパラメーターとして、ヘモグロビン（Hb）値、血小板数、フィブリノーゲン値、アンチトロンビン（AT）III値、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、FDP値及びD-ダイマー値を測定している。このように、非特許文献1においてD-ダイマーは、急性大動脈解離症例の手術におけるトラネキサム酸大量投与の効果を見るために、血液凝固のパラメーターの一つとして測定されたに過ぎない。

【0006】

以上のとおり、非特許文献1には、D-ダイマーを急性大動脈解離の判定マーカーとして使用可能なこと、まして、互いに鑑別が困難だとされている急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別できる判定マーカーとして使用可能なことについて全く記載されていない。

【0007】

また、急性心筋梗塞患者の血液中D-ダイマー濃度（以下「レベル」ということもある）は健常人よりも高いことが一般的に知られている。

【0 0 0 8】

【非特許文献1】

「日本胸部外科学会雑誌」、平成10年7月10日、第46巻、第7号、p. 616-621

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

急性大動脈解離の発生頻度は一般に考えられている以上に高率であり、循環器疾患による急死例では急性心筋梗塞について2番目に多い死因である。

【0 0 1 0】

本疾患は、突然に発症して急速に死に至る転帰をとることが稀ではないため、本疾患と胸痛を主訴とする急性心筋梗塞や肺梗塞、胸部大動脈瘤切迫破裂、気胸などとの鑑別することが非常に重要である。特に、スタンフォードA型の急性大動脈解離では、解離が冠動脈にまで進展し、血管が閉塞することにより急性心筋梗塞の病態を呈することがある。もし誤って、急性大動脈解離患者に急性心筋梗塞に対する治療である血栓溶解療法を施すと、大動脈破裂により死に至らしめる可能性がある。

【0 0 1 1】

以上のとおり、医療の現場において、急性大動脈解離は、激しい胸痛を主訴とする疾患であり、特に、急性心筋梗塞との鑑別が難しく、また、適切な治療のためには、急性心筋梗塞との鑑別が不可欠な疾患である。

【0 0 1 2】

しかしながら、前述のとおり、急性大動脈解離を判定する生化学的マーカーはこれまで知られていない。

【0 0 1 3】

このような状況に鑑み、本発明は急性大動脈解離の判定方法及び判定用試薬を提供することを目的とする。

【0 0 1 4】

【課題を解決するための手段および発明の効果】

本発明者らは急性大動脈解離を発症している患者の血液を採取し、その中に含まれるD-ダイマーを検出した。その結果、健常人よりも高いレベルのD-ダイマーが血液中に存在することが知られている急性心筋梗塞患者と比較しても、はるかに高いレベルのD-ダイマーが急性大動脈解離患者において検出されること、及びそのレベルが後述するスタンフォードA型とB型との間では異なることを見出し、本発明を完成した。

【0015】

(1) 本発明の急性大動脈解離の判定方法は、急性大動脈解離が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴としている。

【0016】

これにより、これまで判定が困難であった急性大動脈解離を発症しているか否かの判定を容易に行うことができ、医師は判定結果に基き適切な処置を施すことができる。また、本発明の別の実施形態によれば、検出されたD-ダイマーのレベルから発症している急性大動脈解離が、後述のスタンフォード分類によるA型に属するものか、又はB型に属するものかを判定することもできる。

【0017】

(5) 本発明の急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定方法は、急性大動脈解離または急性心筋梗塞の両方が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴としている。

【0018】

これにより、激しい胸痛発作を共通の臨床症状として伴う急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別を容易に行うことができ、医師は判定結果に基き適切な処置を施すことができる。また、本発明の別の実施形態によれば、検出されたD-ダイマーのレベルから、発症している急性大動脈解離が、後述のスタンフォード分類によるA型に属するものか、又はB型に属するものかを判定することもできる。

【0019】

(12) 本発明の急性大動脈解離の判定用試薬は、前記判定方法(1)を実施

するために使用され、少なくともD-ダイマーを認識する抗体（以下「抗D-ダイマー抗体」という）を含有することを特徴としている。

この判定用試薬により、前記判定方法（1）と同一の目的を達成することができる。

【0020】

（14）本発明の急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定用試薬は、前記判定方法（5）を実施するために使用され、少なくとも抗D-ダイマー抗体を含有することを特徴としている。

この判定用試薬により、前記判定方法（5）と同一の目的を達成することができる。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明は、急性大動脈解離が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴とする急性大動脈解離の判定方法に関する。

【0022】

本発明の判定の対象となる急性大動脈解離は、大動脈壁を構成する中膜が解離し、内膜側と外膜側に裂けている病態を特徴とする疾患である。なお、大動脈壁は組織学的に血管内腔側から順に、内膜、中膜および外膜から構成される。

【0023】

急性大動脈解離は、解離の発症部位によって臨床症状が異なり、また予後も異なる。このため、発症部位による病型分類が、治療方針決定のために行われている。代表的なスタンフォード（Stanford）分類によれば、解離が心臓から頸部に至る上行大動脈に存在する症例はスタンフォードA型、解離が上行大動脈には存在せず、胸部大動脈から腹部大動脈へ至る下行大動脈に存在する症例はスタンフォードB型と分類される。

【0024】

本疾患の典型的な初発症状は突然に生じる激しい胸痛（胸痛発作）であり、発症部位の大きさによっては、痛みが胸部には限局せず、背部にまで拡大することもある（胸背部痛）。この症状は、大動脈壁が裂けることによる、と一般には理

解されている。

【0025】

急性大動脈解離の上記のような典型的な臨床症状により、本発明の別の実施形態においては、胸痛発作を起したヒトをD-ダイマー検出の対象としている。

【0026】

本明細書において「胸痛発作を起したヒト」とは、血液を分離される以前に胸痛発作を起したヒトのみならず、血液を分離されている時点において胸痛発作を起しているヒトをも意味する。

【0027】

本明細書において「急性大動脈解離の判定」とは、発症している急性大動脈解離の存在の有無を推定するのみならず、その病態の進行の程度を推定することも意味する。

【0028】

本発明において、ヒトから分離された血液中のD-ダイマーの検出は、特に制限されず、たとえば、免疫化学的方法やHPLC法等の各種クロマトグラフィー法などのいずれの方法によっても行うことができる。その中でも特に、抗D-ダイマー抗体を利用する免疫化学的方法により検出を行なうのが好ましい。また、急性大動脈解離の進行度やその経過を判定したい場合には、定量的にD-ダイマーのレベルを検出することができる方法が好ましい。

【0029】

血液中のD-ダイマーの検出に使用される免疫化学的方法としては、特に制限はなく、従来公知の例えば、酵素免疫測定法（EIA法）、ラテックス凝集法、免疫クロマト法、放射免疫測定法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）、ルミネッセンス免疫測定法、スピン免疫測定法、抗原抗体複合体形成に伴う濁度を測定する比濁法、抗体固相膜電極を利用し抗原との結合による電位変化を検出する酵素センサー電極法、免疫電気泳動法、ウェスタンブロット法などが挙げられる。これらの中でも、EIA法、ラテックス凝集法または免疫クロマト法が好ましい。

【0030】

E I A 法においては、2 種類の抗体、特にモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチ E L I S A 法）が抗原（D-ダイマー）に対する特異性および検出操作の容易性において特に好ましい。

【0031】

サンドイッチ E L I S A 法によって D-ダイマーを検出する場合、D-ダイマーに存在する異なるエピトープを認識する 2 種類の抗体、すなわち固相化抗体と酵素標識抗体との間に、D-ダイマーを挟み込み（サンドイッチ）、D-ダイマーに結合した標識抗体の酵素量を測ることにより D-ダイマーを検出することができる。

【0032】

ラテックス凝集法は、抗体感作ラテックス粒子と抗原との凝集反応を利用した免疫化学的方法である。この方法による D-ダイマーの検出は、抗 D-ダイマー抗体感作ラテックス粒子と検体血液中の D-ダイマーとを免疫反応せしめ、その結果生じたラテックス粒子の凝集の程度を測定することにより実施できる。

【0033】

また、免疫クロマト法は全ての免疫化学反応系がシート状のキャリア上に保持されており、血液の添加のみで操作が完了する方法である。本法による D-ダイマーの検出原理は、次のとおりである。まず、検体たる血液がキャリアに滴下されると、血液中の D-ダイマーとキャリア上に配置された標識物（金コロイド等）で標識された抗 D-ダイマー抗体とが免疫反応し、その結果、免疫複合体が生成される。この複合体がキャリア上をクロマト的に展開してゆき、特定部位（判定部位）に固相化された別のエピトープを認識する抗 D-ダイマー抗体に捕捉されると標識物が集積し、その集積度合いを肉眼で観察することによって、D-ダイマーを検出することができる。

【0034】

免疫クロマト法の実施には特別な測定機器は不要であり、病院外での判定や、救急などの迅速な判定が求められる場合には有利な方法である。本方法は一定のレベル以上の D-ダイマーの存在を定性的に検出するのに適しており、後述するカットオフ値をあらかじめ定めた場合には、カットオフ値以上の D-ダイマーを

検出すれば陽性の結果が、また、カットオフ値未満であれば陰性の結果が出るように容易に設定することができる。

【0035】

なお、血液中のD-ダイマーの検出を目的とする上記サンドイッチELISA法やラテックス凝集法などの免疫化学的方法は既に公知であり、これらの方法を検出原理とした試薬は後述のとおり市販されている。これらの試薬を使用すれば、ヒトから分離された血液中のD-ダイマーの検出は容易に実施することができる。

【0036】

本発明において、検体である血液としては、ヒトから分離されたものであればよく、全血、血清、血漿のいずれであってもよい。これらの血液は、ヒトから採取した血液を常法に従って処理することで、適宜、得ることができる。

【0037】

急性大動脈解離の判定は、このようにして検出された血液中のD-ダイマーのレベルを、健常人のレベル、例えば報告されている平均値やその分布範囲、および急性大動脈解離患者のレベル、例えばあらかじめ求めておいた多数患者の平均値やその分布範囲、と比較することにより行うことができる。

【0038】

本発明者らによれば、後記実施例に示すように、急性大動脈解離の患者32名の血液中D-ダイマーレベルの平均値は $33.0 \mu\text{g/mL}$ であった。

【0039】

本発明の判定方法を実施する場合には、公知の一般的な心臓血管系疾患の検査法である他の方法、例えば、胸部単純X線撮影、超音波断層、CTスキャンなどと組み合わせることによって急性大動脈解離の判定はより確実となる。

【0040】

また本発明は、急性大動脈解離または急性心筋梗塞の両方が疑われるヒトから分離された血液中のD-ダイマーを検出することを特徴とする、急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定方法に関する。

【0041】

急性心筋梗塞の典型的な臨床症状は、急性大動脈解離と見分けのつかない胸痛発作である。医療の現場において、胸痛発作等によって急性大動脈解離または急性心筋梗塞の両方が疑われた場合にはそのどちらを発症しているかを判定することは適切な治療を施すためには極めて重要である。なお、急性大動脈解離と急性心筋梗塞はその共通する特徴的な臨床症状に因んで、「二大胸痛疾患」といわれている。

【0042】

急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定は、前述と同様にして検出されたD-ダイマーのレベルを、急性大動脈解離患者のレベル、例えばあらかじめ求めておいた多数患者の平均値や分布範囲、および急性心筋梗塞患者のレベル、例えば報告されている患者の平均値や分布範囲と比較することにより行うことができる。

【0043】

ちなみに、後記実施例において求めた急性心筋梗塞患者の血液中D-ダイマーレベルの平均値は $0.39 \mu\text{g/mL}$ であった。

【0044】

また、急性心筋梗塞との間で、D-ダイマーのカットオフ値をあらかじめ設定しておき、検出されたD-ダイマーのレベルが前記カットオフ値以上の場合には、急性大動脈解離を発症している可能性が高く、また、検出レベルが前記カットオフ値未満の場合には、急性大動脈解離ではなく急性心筋梗塞を発症している可能性が高いとの判定をすることができる。

【0045】

「カットオフ値」とは、その値を基準として疾患の鑑別をした場合に、高い有病正診率（診断感度）及び高い無病正診率（診断特異度）の両方を満足できる値である。すなわち本発明の場合におけるカットオフ値は、急性大動脈解離を発症している患者で高い陽性率（カットオフ値以上）を示し、かつ、急性心筋梗塞を発症している患者で高い陰性率（カットオフ値未満）を示す血液中のD-ダイマー濃度である。

【0046】

カットオフ値の算出方法は、この分野において周知である。すなわち、多数の患者（急性大動脈解離患者及び急性心筋梗塞患者）についてD-ダイマーを検出し、検出された各レベルにおける、有病正診率および無病正診率を求め、これらの値を基にして、ROC（Receiver Operating Characteristic）曲線を作成する。そして、有病正診率と無病正診率が可能な限り100%に近いときのD-ダイマー濃度を求め、その値をカットオフ値とする（図1参照）。なお、ROC曲線は、市販の解析ソフトを使用して作成することもできる。

【0047】

例えば、後記実施例で求めた、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別が可能な血液中D-ダイマーのカットオフ値は、 $0.7 \mu\text{g/mL}$ （実施例2）と $1.3 \mu\text{g/mL}$ （実施例4）であった。このようなカットオフ値は、特定の値をとるものではなく、D-ダイマーの検出に使用される患者母集団に依存して変動する。なお、可能な限り多数の患者を母集団として使用した場合には、カットオフ値は一定の値に収束し、臨床の場合においてはその値がカットオフ値として使用される。

【0048】

また、同一の検体を対象とした場合でも、D-ダイマーの測定値は、使用方法や試薬によってばらつきがあるので、カットオフ値は測定方法や試薬ごとに設定する必要がある。

【0049】

上記本発明の判定方法を実施する場合には、公知の一般的な心臓血管系疾患の検査法である他の方法、例えば、胸部単純X線撮影、超音波断層、CTスキャンなどと組み合わせることによって、急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定はより確実となる。

【0050】

本発明の判定方法の別の実施形態は、急性大動脈解離をスタンフォードA型またはB型に限定した場合の判定方法に関する。かかる判定方法は、前述した急性大動脈解離の判定方法又は急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性大動脈解離を発症しているかの判定方法と同様にして実施することができる。

【0051】

後記実施例において、急性大動脈解離患者32名のうち、スタンフォードA型18名の平均値は $48.3 \mu\text{g/mL}$ であり、スタンフォードB型14名の平均値は $14.5 \mu\text{g/mL}$ であって、この両者間には明らかな血液中D-ダイマーレベルの差が認められている。

【0052】

また、本発明は、上記本発明の判定方法のうち、免疫化学的方法を実施するために使用され、少なくとも抗D-ダイマー抗体を含有する急性大動脈解離の判定用試薬に関する。

【0053】

かかる判定用試薬は、免疫化学的方法により血液中のD-ダイマーを検出して、急性大動脈解離を判定する場合に好適に使用することができ、かかる判定方法と同一の目的を達成するものである。

【0054】

本発明の判定用試薬に含有される抗D-ダイマー抗体は、ヒトから分離された血液中に存在するD-ダイマーを認識し、D-ダイマーとの特異的な免疫反応性を有するものであれば、ポリクローナル抗体であるか、モノクローナル抗体であるかを問わない。両者のうち、抗体の安定供給の点において、また、D-ダイマーに対する高い特異性及び均一性の点においてモノクローナル抗体が好ましい。

【0055】

このような抗D-ダイマー抗体は公知の手段により製造することができ、遊離の状態、標識された状態または固相化された状態で免疫化学的方法に適用される。

【0056】

ポリクローナル抗体は、常法によりヒトの血液から分離・精製したD-ダイマーを適当なアジュバントとともにマウス、ラット、ウサギなどの動物に免疫し、血液を採取して公知の処理をなすことにより製造することができる。

【0057】

またモノクローナル抗体は、このように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、

ミルシュタインらの方法によりミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング及びクローニング等を行い、抗D-ダイマー抗体を産生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。ここで、免疫抗原として利用されるD-ダイマーは、必ずしもヒトの血液中に存在する天然のD-ダイマーである必要はなく、遺伝子工学的手法により得られる組換え型D-ダイマーやそれらの同効物（断片）であってもよい。

【0058】

本発明の判定用試薬にサンドイッチELISA法を採用する場合、かくして得られた抗D-ダイマー抗体は、固相化抗D-ダイマー抗体及び酵素標識抗D-ダイマー抗体の形態で使用する。

【0059】

固相化抗D-ダイマー抗体は、前述のようにして得られた抗体を固相（例えば、マイクロプレートウェルやプラスチックビーズ）に結合させることにより製造することができる。固相への結合は、通常、抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間（1～2日）接触させることにより行うことができる。

【0060】

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために、牛血清アルブミン（BSA）や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝溶液を固相と接触させ、抗体によってコートされなかった固相表面部分を前記BSAや牛ミルク蛋白等でブロッキングすることが一般に行われる。

【0061】

酵素標識抗D-ダイマー抗体は、上記固相化された抗体とは異なるエピトープを認識する抗D-ダイマー抗体と、酵素とを結合（標識）させることにより製造することができる。該抗体を標識する酵素としては、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等が挙げられる。これらの酵素と抗D-ダイマー抗体との結合はそれ自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行うことができる。

【0062】

また、酵素標識抗D-ダイマー抗体を使用する代わりに、アビジン-ビオチン反応を利用した方法（酵素の代わりにビオチンで標識した抗体を血液中のD-ダイマーに反応させ、その後に酵素標識ストレプトアビジンを結合させる方法）を利用して、D-ダイマーの検出を行ってもよい。

【0063】

サンドイッチELISA法では、固相化抗D-ダイマー抗体及び酵素標識抗D-ダイマー抗体以外に必要な応じて、酵素基質、発色剤、洗浄液、反応停止液、基質溶解液、標準抗原などが使用される。本発明は、上記抗D-ダイマー抗体以外にこれらを構成試薬として含んで成る急性大動脈解離の判定用キットの形態で実現されてもよい。

【0064】

上記キットの中に含まれる酵素基質は、抗D-ダイマー抗体に結合された標識酵素に応じて適当なものが選択される。例えば、酵素がアルカリフォスファターゼの場合においてはp-ニトロフェニルホスフェート（PNPP）等が選択される。この場合には、発色剤としてo-フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）などが使用される。また、洗浄液、反応停止液、基質溶解液についても、選択した標識酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

【0065】

なお、サンドイッチELISA法によるD-ダイマーの検出試薬やキットが多数販売されており（例えば、ベーリンガーマンハイム社「アセラクロムDダイマー」（商品名）、富士レビオ社「ダイマーテストEIA」（商品名）など）、これらの試薬等を本発明の急性大動脈解離の判定用試薬として使用することもできる。

【0066】

本発明の判定用試薬にラテックス凝集法を採用する場合、抗D-ダイマー抗体は、ラテックス感作抗D-ダイマー抗体の形態をとる。ラテックス粒子と抗D-ダイマー抗体との感作（結合）は、この分野で公知の方法、例えば、化学結合法（架橋剤としてカルボジイミドやグルタルアルデヒド等を用いる方法）や物理吸

着法により成すことができる。

【0067】

ラテックス凝集法では、上記ラテックス感作抗体以外に必要な応じて、希釈安定化緩衝液、標準抗原などが使用される。本発明は、ラテックス感作抗体以外に、これらを構成試薬として含んで成る急性大動脈解離の判定用キットの形態で実現されてもよい。

【0068】

なお、ラテックス凝集法によるD-ダイマーの検出試薬やキットが多数販売されており（例えば、ダイアヤトロン社「エルピアエースD-Dダイマー」（商品名）、日本ロッシュ社「コアグソルD-ダイマー」（商品名）など）、これらの試薬等を本発明の急性大動脈解離の判定用試薬として使用することもできる。

【0069】

本発明の判定用試薬に免疫クロマト法を採用する場合、抗D-ダイマー抗体は、固相化抗D-ダイマー抗体及び標識抗D-ダイマー抗体の形態で使用される。このような免疫クロマト法による本発明の判定用試薬は、Watanabe et al., Clinical Biochemistry 34(2001)257-263に記載の方法に準じて製造することができる。

【0070】

本発明の判定用試薬は、実際の医療現場において、商業パッケージの形態で提供される。かかる商業パッケージは上記判定用試薬をその中に含み、該判定用試薬を急性大動脈解離の判定に使用できる、または使用すべきであることが該パッケージ外箱に記載されているか、又は、そのように記載した該判定用試薬に関する記載物（いわゆる添付文書）を該パッケージ中に含むものである。

【0071】

また本発明は、上記本発明の急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定方法のうち、免疫化学的方法を実施するために使用され、少なくともD-ダイマーを認識する抗体を含有する、急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかの判定用試薬に関する。

【0072】

かかる試薬は、前述した急性大動脈解離の判定用試薬と同一の構成をとるものであり、免疫化学的方法により血液中のD-ダイマーを検出し、急性大動脈解離を発症しているか、又は、急性心筋梗塞を発症しているかを判定する場合に好適に使用することができ、かかる判定方法と同一の目的を達成するものである。

【0073】

上記判定用試薬は、実際の医療現場において、商業パッケージの形態で提供される。かかる商業パッケージは上記判定用試薬をその中に含み、該判定用試薬を急性大動脈解離と急性心筋梗塞の鑑別に使用できる、または使用すべきであることが該パッケージ外箱に記載されているか、又はそのように記載された該判定用試薬に関する記載物（いわゆる添付文書）を該パッケージ中に含むものである。

【0074】

本発明の判定用試薬および商業用パッケージの別の実施形態は、急性大動脈解離がスタンフォードA型またはB型に限定された場合の判定用試薬および商業パッケージに関する。

【0075】

かかる判定用試薬および商業パッケージは、本発明の判定方法において、急性大動脈解離をスタンフォードA型又はB型に限定した前述の場合と同一の目的を達成するものである。

【実施例】

以下、実施例に基いて本発明をさらに具体的に説明する。

【0076】

実施例1；急性大動脈解離を発症している患者血液中のD-ダイマーの検出（急性心筋梗塞患者との比較）

【0077】

胸痛（胸背部痛含む）を訴えて来院した患者のうち、急性大動脈解離と確定診断された症例（スタンフォードA型18例、スタンフォードB型14例の計32例）及び、急性心筋梗塞と確定診断された症例（18例）の血液中D-ダイマー濃度を、ラテックス凝集法を測定原理とするD-ダイマー測定試薬「STAライアテストD-ダイマー」（商品名、ロッシュダイアグノスティックス社製）を使

用して以下のとおり測定した。なお、これらの症例からはインフォームドコンセントを得た。

患者の静脈から市販のクエン酸ナトリウム採血管（インセパクターC凝固検査用（積水化学工業）、3.13%クエン酸ナトリウム0.2mL含有）に1.8mLの全血を採取した。その後、採血管を緩やかに転倒混和し、3000rpmで5分間、室温で遠心分離した。遠心分離後の採血管をそのままD-ダイマー測定自動装置であるSTA（ロシュダイアグノスティックス社製）にセットし、分析した。D-ダイマーの測定には上記測定試薬を用いた。分析条件は、検体血液量50 μ L、緩衝液（試薬1；トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン11.5mg/mL, γ -ヒドロキシ化ナトリウム 1mg/mL, NaCl 23.5mg/mL, ナイパジン 0.95mg/mL）100 μ L、希釈液50 μ L、ラテックス感作抗D-ダイマー抗体液（試薬2；抗ヒトD-ダイマーマウスモノクローナル抗体55 μ g/mL, ラテックス 0.65mg/mL, ウシ血清アルブミン 3mg/mL, ナイパジン 0.95 mg/mL, γ -ヒドロキシ化ナトリウム 1mg/mL）150 μ Lを自動的に添加し、分析時間240秒、反応温度37 $^{\circ}$ Cで測定した。この測定試薬の検量線範囲はD-ダイマー濃度0.2 \sim 4.0 μ g/mLであり、この濃度範囲を超える高値検体は再検査の対象とした。高値検体はSTA機器用希釈液で予め所定の希釈倍数で希釈し、再度STA装置に掛けて検体中のD-ダイマー濃度を測定した。D-ダイマーの測定値はオンラインでコンピューター処理及び管理された。

測定結果は下記〔表1〕に示すとおりであり、急性大動脈解離を発症している患者におけるD-ダイマーの血液中濃度は、急性心筋梗塞患者に比べてはるかに高かった。両群間にはウェルチのt検定により統計学的に有意差が認められた。また、急性心筋梗塞群とスタンフォードA型群および急性心筋梗塞群とスタンフォードB型群との比較においても統計学的に有意な差が認められた。

なお、スタンフォードA型群とB型群との間においても統計学的に有意な差が認められている。

【0078】

【表 1】

急性大動脈解離患者及び急性心筋梗塞患者の血液中のD-ダイマー濃度

患 者	症例数	D-ダイマー ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (平均 \pm 標準偏差)
急性大動脈解離 (スタンフォードA型及びB型)	32	$33.0 \pm 59.8^{**}$
スタンフォードA型	18	$48.3 \pm 77.4^{*}$
スタンフォードB型	14	$14.5 \pm 15.2^{**}$
急性心筋梗塞	18	0.39 ± 0.39

* ; 急性心筋梗塞群との比較において5%水準で有意差あり

** ; 急性心筋梗塞群との比較において1%水準で有意差あり

【0079】

実施例2 ; カットオフ値の設定 (急性心筋梗塞を鑑別の対照疾患とした場合)

【0080】

胸痛 (胸背部痛含む) を訴えて来院した患者のうち、急性大動脈解離と確定診断された症例 (60例) 及び、急性心筋梗塞と確定診断された症例 (37例) から血液を採取し、実施例1と同様にして、D-ダイマー濃度を測定した。なお、これら症例からはインフォームドコンセントを得た。

得られた測定値についてROC曲線分析を、ROC解析ソフト「MedCalc」 (商品名、Med Calc Software社 [ベルギー]) を使用して行い、急性大動脈解離と急性心筋梗塞との鑑別が可能なD-ダイマーのカットオフ値を算出した。算出された値は $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。図1はそのときのROC曲線であり、また、図2は測定値の分布を表す。なお、カットオフ値 $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ の診断感度 (急性大動脈解離症例中の陽性症例の割合) は91.9%であり、一方、診断特異度 (急性心筋梗塞症例中の陰性症例の割合) は90.0%という非常に精度の高いものであった。このように、血液中のD-ダイマー濃度の $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ は、急性大動脈解離、そしてそれとの類症鑑別が最も必要とされる急性心筋梗塞とを明確に鑑別できるカットオフ値であった。

また、図1に示すROC曲線の曲線下面積 (AUC ; area under curve) は0

・ 968 という 1 に非常に近い値であった。このことは血液中の D-ダイマー濃度が、急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別するのに有用なマーカーであることを意味する。

【0081】

実施例 3；実施例 2 で求めたカットオフ値の適用

【0082】

実施例 2 で設定した急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別するためのカットオフ値 ($0.7 \mu\text{g/mL}$) の診断精度を確かめるために、実施例 1 の症例である急性大動脈解離患者および急性心筋梗塞患者の陽性率 (カットオフ値以上を示した症例の割合) を求め、下記 [表 2] に示す。

【0083】

【表 2】

急性大動脈解離患者及び急性心筋梗塞患者における陽性率

患 者	症例数	陽性例数	陽性率 (%)
急性大動脈解離 (スタンフォード A 型及び B 型)	32	29	90.6
スタンフォード A 型	18	17	94.4
スタンフォード B 型	14	12	85.7
急性心筋梗塞	18	3	16.7

カットオフ値: $0.7 \mu\text{g/mL}$

【0084】

上記 [表 2] に示すとおり、実施例 1 の症例においても、 $0.7 \mu\text{g/mL}$ にカットオフ値を設定した場合に、急性大動脈解離患者において極めて高い陽性率 (すなわち、診断感度が 90.6%) を示した。また、急性大動脈解離患者 18 症例のうち、15 症例はカットオフ値よりも低い値であり、診断特異度は 83.3% に達している ($100\% - 16.7\%$)。このことは $0.7 \mu\text{g/mL}$ が急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを明確に鑑別できるカットオフ値であることを意味する。

【0085】

実施例 4 ; 実施例 1 の症例におけるカットオフ値の設定

【0086】

また、実施例 1 の症例について、実施例 2 に記載の方法と同様にして急性大動脈解離と急性心筋梗塞とを鑑別可能なカットオフ値を求めた。算出されたカットオフ値は $1.3 \mu\text{g/mL}$ であった。このときの ROC 曲線の曲線下面積は 0.960 であり、また、このカットオフ値の診断感度は 87.9%、診断特異度は 100% であって極めて診断精度の高い値である。

【図面の簡単な説明】

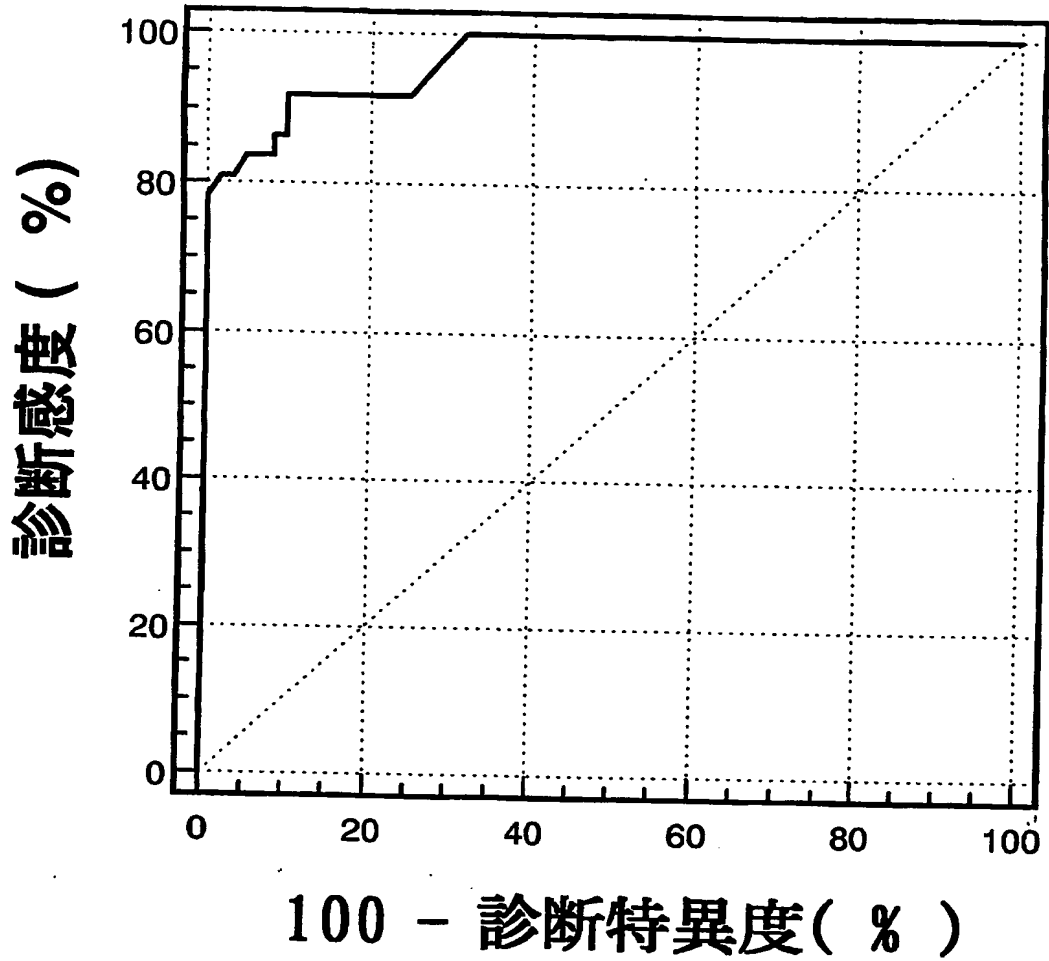
【図 1】 実施例 2 における急性大動脈解離症例および急性心筋梗塞症例の血液中 D-ダイマー濃度から作成したの ROC 曲線である。

【図 2】 実施例 2 における急性大動脈解離症例および急性心筋梗塞症例の血液中 D-ダイマー濃度の分布図である。

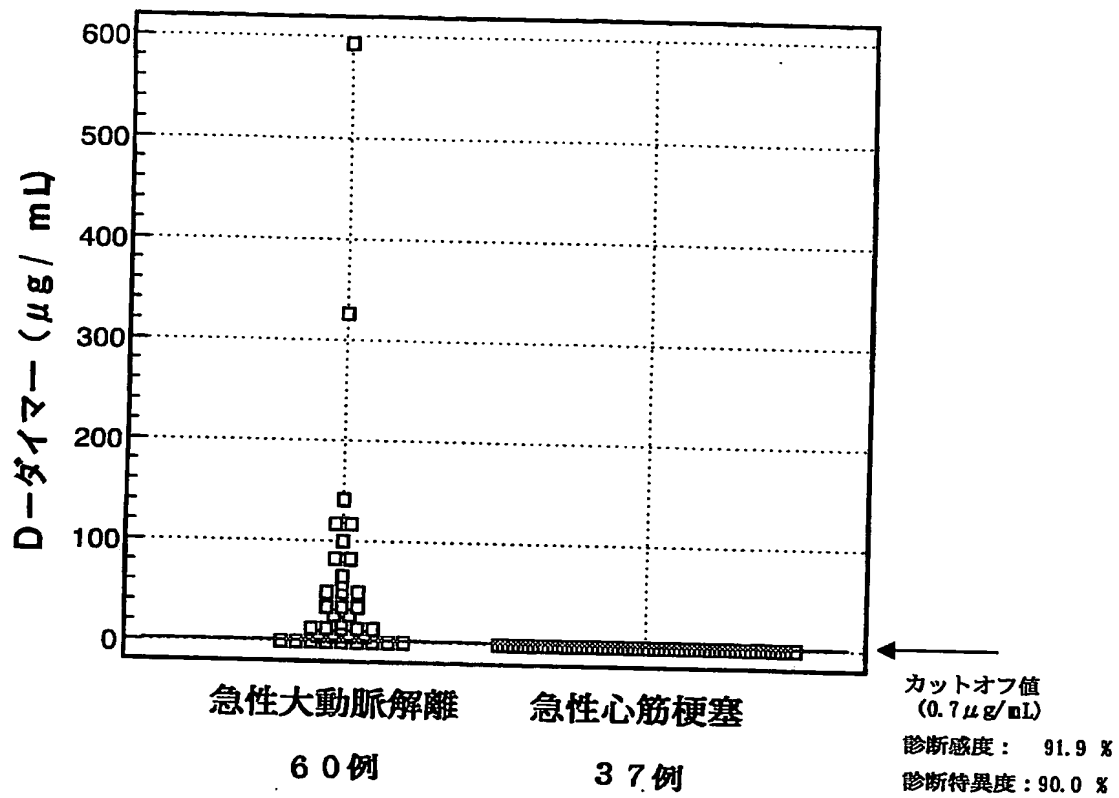
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 急性大動脈解離を判定する方法および判定する試薬などを提供する。

【解決手段】 急性大動脈解離が疑われる患者から血液を採取して、その中に含まれるD-ダイマーを検出し、検出されたレベルに基づいて、急性大動脈解離を発症しているか否かを判定することができる。また、急性大動脈解離か、又は急性心筋梗塞の両方が疑われる患者においても前記と同様にして、急性大動脈解離と急性心筋梗塞のどちらを発症しているかを判定することができる。血液中のD-ダイマーを測定する試薬を使用してこれらの判定を実施することができる。

【選択図】 図 2



特願 2003-165456

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002912]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号

氏 名

大日本製薬株式会社